

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 C12P 21/08, G01N 33/577, 33/68 // C12N 15/06 (C12P 21/08 C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/04700
		(43) 国際公開日 1994年3月3日 (03.03.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01136 (22) 国際出願日 1993年8月11日 (11. 08. 93) (30) 優先権データ 特願平4/214967 1992年8月12日 (12. 08. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林正和 (KOBAYASHI, Masakazu) [JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市花屋敷松ガ丘23-4 Hyogo, (JP) 大塚一幸 (OHTSUKA, Kazuyuki) [JP/JP] 〒559 大阪府大阪市住之江区南港中5-5-36-221 Osaka, (JP) 田中洋和 (TANAKA, Hirokazu) [JP/JP] 〒665 兵庫県宝塚市花屋敷荘園3-10-21 Hyogo, (JP) 丹羽峰雄 (NIWA, Mineo) [JP/JP] 〒617 京都府向日市上植野町切之口7-15 Kyoto, (JP) (74) 代理人 弁理士 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime) 〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル Osaka, (JP)	(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。	
(54) Title : MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZING FK506-BINDING PROTEIN, METHOD OF ASSAYING FK506-BINDING PROTEIN LEVEL, AND KIT THEREOF		
(54) 発明の名称 FK506結合蛋白質を認識するモノクローナル抗体、FK506結合蛋白質の濃度測定法、および測定用キット		
(57) Abstract <p>The invention relates to a monoclonal antibody (anti-FKBP antibody) which recognizes an antigenic determinant present in an FK506-binding protein (FKBP) and does not inhibit the binding between FKBP and FK506, a method of assaying a plasma FKBP level which comprises reacting an immobilized anti-FKBP antibody with an enzyme-labelled FK506 and FKBP present in a specimen and determining the extent of color development of the enzyme-substrate complex formed thereby, and a kit therefor. The invention serves to facilitate a more accurate assay of a plasma FKBP level which affects the immunosuppressive activity of FK506, whereby the optimal FK506 dose can be determined in close accordance with the condition of each individual patient.</p>		

(57) 要約

本発明は、FK-506結合蛋白質中の抗原決定基を認識し、FK506結合蛋白質とFK506との結合を阻害することのないモノクローナル抗体（抗FKBP抗体）、および固定化された抗FKBP抗体に酵素により標識されたFK506及び被験試料中のFKBPを反応させた後、酵素基質の発色度合いを測定することを特徴とする血漿中のFKBP濃度測定方法、ならびに測定用キットに関する。

本発明によれば、FK506の免疫抑制作用に影響を与える血漿中のFKBP濃度を簡便に、より正確に測定できるようになり、個々の患者の状態に応じた最適のFK506の投与量をきめ細かく設定できるようになる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		

明 細 書

FK 506 結合蛋白質を認識するモノクローナル抗体、FK 506 結合蛋白質の濃度測定法、および測定用キット

「技術分野」

本発明は、免疫抑制活性を有するFK 506 に結合する蛋白質（FK 506 結合蛋白質）を認識するモノクローナル抗体、該FK 506 結合蛋白質の濃度測定法、およびその測定用キットに関するものであり、医療の分野で利用できる。

「背景技術」

FK 506 もしくはFR-900506とも表記される化合物は、強力な免疫抑制作用を有し、臓器移植時の拒絶反応や自己免疫疾患の予防剤または治療薬として使用しうることがよく知られている（例えば特開昭61-148181号）。

しかしながら、その作用は、非常に強力であるため、最適投与量の決定は重要な問題であり、副作用等を発生させることなく、効果的な免疫抑制活性を発揮させ得る量を投与することが極めて重要である。

一方、その後の研究により、FK 506 の免疫抑制作用はペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼと同様な活性を有する、細胞内のFK 506 結合蛋白質（以下、FKBPと表記）と結合することにより発揮すると考えられている

〔例えば、Nature, 357, 692-694および695-697（1992）〕。

該FKBPは、その分子量の違いによって数種のタイプが存在することが知られており、例えばFKBP-12（分子量12KDa）、FKBP-13（分子量13KDa）、FKBP-25（分子量25KDa）、FKBP-56（分子量56KDa）、FKBP-80（分子量80KDa）等が報告され、それぞれの構造も既に決定されている。

たとえば、Nature, 341, 755-757および758-760（1989）、J. Am. Chem. Soc. 113, 1409-1411（1991）、Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 6229-6233（1991）等参照。

また、分子量 11,819 ダルトンで 107 個のアミノ酸からなる FKBP は遺伝子工学技術を用いて製造する手段も既に報告されている〔Nature, 346, 671-674 (1990)〕。

一方、それら、FKBP の中で FK506 が最も強く結合するのは、FKBP-12 であり、その親和性定数 (K_d) は 0.4 nM であること、更に、FKBP-12 はリンパ球のみならず、赤血球を含めたあらゆる組織に多く存在していることも報告されている〔Trans. Proc. 23 (6), 2760-2762 (1991)〕。

ところで、マウス MLR の系で、FKBP-12 を一定量の FK506 と共に添加すると、添加する FKBP-12 の量に比例して、FK506 の免疫抑制効果が阻害されることにより、血中に FKBP-12 が存在すれば、FK506 が血漿中の FKBP-12 に結合され、その免疫抑制効果が血漿中濃度から予想される程、得られないことになる。手術後などでは、患者の赤血球が溶血し、赤血球の FKBP-12 が血漿中に循環すること、及び、患者により感受性に差があることを考えれば、患者の FK506 感受性を推測し、より望ましい FK506 血漿中濃度を設定する為に、血漿中 FKBP 濃度を正確に測定する技術の開発が望まれていた。

「発明の開示」

本発明の目的は、FKBP を認識するモノクローナル抗体を提供すること、及び望ましい FK506 血漿中濃度を設定する為に、血漿中 FKBP 濃度を正確に測定する方法を提供すること、さらには、その濃度測定に供する測定用キットを提供することである。

本発明の発明者等は、鋭意研究の結果、FKBP の抗原決定基を認識し、FKBP と FK506 との結合を阻害することのないモノクローナル抗体を製造することに成功し、更に血漿中 FKBP 濃度を正確に測定する方法、ならびに測定用キットを確立した。

すなわち、本発明は、FKBP 中の抗原決定基を認識し、FKBP と FK506 との結合を阻害することのないモノクローナル抗体、また固定化された該モノ

クローナル抗体に、酵素により標識されたFK506及び被験試料中のFKBPを反応させることから成るFKBP濃度測定法、固定化されたFKBPに、酵素により標識されたFK506及び被験試料中のFKBPを反応させることから成るFKBP濃度測定法、さらには、該モノクローナル抗体、FKBP、及び酵素により標識されたFK506からなるFKBPの濃度を測定するためのキットに関する。

FKBPの抗原決定基を認識し、FKBPとFK506との結合を阻害することのないモノクローナル抗体（以下、抗FKBP抗体と表記）は、例えば、ケーラーとミルスタイン（Kohler and Milstein）の基本方法〔Nature, 256, 495（1975）〕のような常法の細胞融合法より製造することができる。

好ましくは、FKBPで免疫したマウスから得られた脾細胞と、マウス骨髄腫細胞とを細胞融合してハイブリドーマを製造し、その中から後述の実施例1あるいは実施例2のような方法で、FKBPを認識するがFKBPとFK506との結合を阻害しないモノクローナル抗体を調製することができる。より好ましくは、IgGやIgMのクラスであり、最も好ましくは、IgG, λ やIgG, κ のようなサブクラスである。本発明の方法により、特に12kdのFKBPのみと反応するか、または12kd及び30～35kdの両方のFKBPと反応する抗FKBP抗体が得られる。

本発明におけるFKBP濃度測定法は、抗FKBP抗体を用い、めざすFKBPのみを選択的に測定する2ステップ法と、FK506が結合する全てのFKBPを非選択的に測定する1ステップ法に大別することができる。

2ステップ法においては、1) まず、目的とする種類のFKBP中の抗原決定基を認識するが、FKBPとFK506との結合には影響を与えることのない抗FKBP抗体をイムノプレートのような固相に、抗マウスIgG（H+L）のようなIgGを用いて固定化し、2) そして、FKBPを含有する被験試料（検量線作成の際には段階希釈したFKBP）及びペルオキシダーゼ（以下PODと表記）のような酵素で標識されたFK506（例えば、後述実施例1のようにして

製造したFK506-C32(LA)-PODとを反応させ、3)最後に、
-フェニレンジアミンと過酸化水素水のような酵素基質溶液を用い、抗FKBP
抗体と結合しているFKBPに捉えられている酵素標識FK506の量に応じて
観測される基質の発色の度合いを吸光度測定することにより、FKBP濃度を
知ることが出来る。

一方、1ステップ法においては、1)まず、イムノプレートのような固相にFKBP-12のようなFKBPを固定化し、2)そして、FKBPを含有する被験試料(検量線作成の際には段階希釈したFKBP)及びFK506-C32

(LA)-PODのような酵素標識FK506とを反応させ、3)被験試料中のFKBPと固定化されたFKBPとの競合反応を行わせ、固定化されたFKBPに捉えられている酵素標識FK506が、被験試料中のFKBPの量に応じて減少する度合いを2ステップ法のような酵素基質溶液を用いて測定することにより、被験試料中のFKBP濃度を知ることができる。

尚、この1ステップ法は、酵素標識したFK506が、試料中の全てのFKBPと反応する為、FK506の活性に影響を与える被験試料中の全てのFKBP濃度を測定することができるという特徴がある。

また、本発明の抗FKBP抗体は、これとFKBP標準品、および酵素標識したFK506とから成るFKBP濃度測定用キットとし、上記2ステップ法による濃度測定に供することができる。

本発明により、免疫抑制作用の効果に影響を与える血漿中FKBP濃度を簡便に、より正確に測定することができ、FK506の最適投与量を決定する際の重要な判断材料を提供することが可能となった。

そして、必要に応じ、ある特定のFKBP(例えば、FKBP-12)のみの濃度を選択的に測定したり、全てのFKBPの総濃度を測定出来るようになったため、実際の医療の場で、個々の患者の状態に応じたFK506の投与量をきまこまかく設定できるようになった。

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 抗FKBP抗体の製造

(1) FKBP-12の製造と特徴

Nature, 346, 671-674 (1990) の中でHarvard 大学S. L. Schreiberらの報告しているDNA sequence より、FKBP-12のC-末に相当するDNA 48 merをApplied Biosystem社のDNA synthesizerを使って合成した。

5' -CCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAG
CTTCTAAAACTGGAATGA-3'

この48-merの末端を²⁵Pでラベルし、プローブとしてCLONTECH社のヒトT-cell cDNAライブラリーHL1016b 50万ブランクをスクリーニングしたところ、ポジティブブランクを一つ得た。このブランクよりFKBP-12 cDNAを含む断片をサブクローニングした〔pUC-23 (Ec)〕。このpUC-23 (Ec)をシーケンスしたところ、N-末DNAシーケンス1番から32番に相当する部分が欠損していたので、この部分を補完すると共に、大腸菌での発現を高くする為に合成した AT rich silent mutant N-末DNA約80 b.p. とを利用し、EcoRI-BamHI siteとして、tryptophan promotorの制御下で発現するプラスミドに組み込み、発現ベクターpFKBP 333を得た。これを、E. coli HB101に形質転換し、発現菌HB101/pFKBP (AT) 311を得た。これを、L-amp. brothにて19時間培養し、蛋白合成の誘発は、90 μg/ml (final濃度)となる様にIAA (Indol-Acrylic acid)を添加することにより行った。E. coli を集菌し、50mM Tris-HCl, 2mM β-ME, 2mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, 5% glycerol中でFrench Pressにて細胞を粉碎し、遠心(4℃, 6,000×g, 30分) - 上清を60℃, 15分間熱処理 - 遠心(4℃, 6,000×g, 45分 + 4℃, 18,000×g, 20分×2回) - 透析〔20mM Tris-HCl (pH7.4), 4℃ 終夜〕 - DEAE-Toyo PEARL 650M - 逆相HPLC (C4)にてFKBP-12を精製した。

(2) FKBP-12のマウスへの免疫

FKBP-12のリン酸緩衝液（以下、PBSと表記） $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ 0.1ml と等量のFreund's Complete Adjuvant (FCA)を混合し、マウスBALB/cの腹腔内に免疫した。同量のFKBP-12をFreund's Incomplete Adjuvant (FIA)と混合し、およそ10日毎に数回、腹腔内に免疫した。

(3) 血中抗体価の測定

マウス尾静脈より $10 \mu\text{l}$ を採血し、PBS $990 \mu\text{l}$ と混合し、測定試料とした。測定に当たっては、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のFKBP-12 PBS溶液 $50 \mu\text{l}$ をイムノプレートウェルに加え、室温3時間反応させ、表面に結合させる。その後、ウェルを洗浄、0.2%ミルクブロッカーPBSで結合サイトをブロックし、再び洗浄後、試料希釈血清を加え、室温下1時間反応させる。anti-mouse IgG (H+L) -POD [ベクター (Vector Lab.) 社製] $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 添加し、室温で更に1時間反応させる。洗浄後、常法によりオ-フェニレンジアミンの系で発色させた。

(4) 抗FKBP-12抗体の産生

抗体価の上昇が見られたマウスに更に最終免疫としてFKBP-12 $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ (PBS) 0.2ml を尾静脈から注射した。4日後に脾臓を抽出し、脾臓細胞 1.44×10^8 cellsを調整した。一方、マウス骨髓腫細胞P3X63Ag8U.1を 2.9×10^7 cell調整し、50%PEG4000中（最終濃度）で細胞融合を行った。その後、HAT培地にて24ウェルプレート上、 10^6 cells/ $\text{ml} \times 1\text{ml}/\text{ウェル}$ で融合細胞のスクリーニングを行った。2週間後、HAT培地で細胞の成育が確認できた144ウェルについて、抗FKBP-12抗体の産生をスクリーニングした。つまり、血中抗体価の測定法において、抗FKBP-12抗体を含む試料を添加反応させる時に、final $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のFKBP-12を共存させ、FKBP-12存在下での発色が消失するものを選択した。更にFKBP-12に対して抗体価の高いクローン32クローンを選択した。

(5) FKBP-12を認識し、FK506, FK506-C32(LA) -PODとFKBP-12との結合を阻害しない抗FKBP-12抗体の選択

固相に抗マウス IgG (H+L) を結合させ、更にスクリーニングの抗体を結合させた後、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の FKBP-12 $50 \mu\text{l}$ と下記 (6) で得られた FK506-C32 (LA)-POD (1000倍希釈) $50 \mu\text{l}$ とを共存させ、 α -フェニレンジアミンとの反応により生じた 490 nm での吸光度の上昇が見られたクローンを選択した。この時、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の FK506 を共存させた時の発色の消失により、抗マウス IgG (H+L) により結合された FKBP-12 は FK506-C32 (LA)-POD の FK506 を認識していることが分かる。その結果、FKBP-12 をそのまま抗原として用いた免疫法からは 5 種類の抗体 (5-1-A5, 5-1-B3, 5-1-C5, 5-2-D1 (IgG₁), 5-4-D2)、下記 (7) によろ FKBP-12 を尿素で変性させたものを抗原として用いた免疫法からは IA4 (IgM), 3A8 (IgG₃)、IF7、3B8、また、下記 (8) のように FKBP-12 をオブアルブミンと結合させたものを抗原として用いた免疫法からは 4F8 の合計 7 種のモノクローナル抗体が得られた。

(6) FKBP506-C32 (LA)-POD の製造法

特開平 1-92659 号の実施例 1 と同様にて得られたコハク酸-FR-90056 物質ハーフエステル (230 mg)、N-ヒドロキシサクシンイミド (35 mg) 及び 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (43 mg) の塩化メチレン溶液 (10 ml) を室温下 5 時間攪拌した後、反応混合物を水洗し、さらに乾燥した。溶媒を留去した後、得られた残渣 (250 mg) を 11-アミノウンデカン酸 (120 mg) 及びトリエチルアミン (60 mg) とともにジメチルホルムアミド-水 (1:1, 20 ml) 溶媒中で室温下 6 時間攪拌した。反応混合物は水洗後乾燥した上で溶媒を留去し、得られた残渣をクロロホルムを展開溶媒とするシリカゲルカラムに付し、17-アリル-1, 14-ジヒドロキシ-12-[2-(4-N-(10-カルボキデシル)-(4-アミノ-1, 4-ジオキソ-1-ブチルオキシ))-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22.3.1.0^{4,6}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10,

16-テトラオン (120mg) を得た。

NMR (CDCl₃, δ) : 1.2-1.4 (m), 5.9-6.1 (1H, m)

FAB MASS : 1109 (M + Na)⁺

更に、上記化合物を用い、特開平1-92659号の実施例1の3)と同様に
してホースラディッシュ・ペルオキシダーゼを反応させることにより、FK50
6-C32 (LA)-POD溶液を得た。

(7) 尿素変性FKBP-12の調製

FKBP-12の0.08%トリフルオロ酢酸含有水溶液 (847 μ g/ml) 460
 μ lに尿素312mgを添加し、室温下、混合攪拌し、FKBP-12 (600
 μ g/ml) の溶液650 μ lを調製した。これを、このまま免疫に使用した。

(8) オブアルブミン結合FKBP-12の調製

FKBP-12 1032 μ g (1mg/mlを1032 μ l使用) とオブア
ルブミン (シグマ社、Lot No. 76F-8040) のPBS溶液 (2mg
/ml) 1032 μ lを混合する。これに、0.13Mグルタルアルデヒド-P
BS溶液0.62mlを滴下する。室温下、14時間攪拌し、その後、PBS1
lに対し、3回透析し、これを免疫原として使用した。

FKBP-12とオブアルブミンとの混合比率は、FKBP-12 1032
 μ g : オブアルブミン2064 μ gで、溶液量は2.7mlであった。

実施例2 抗FKBP-12抗体の製造

(1) 実施例1の(1) および(2) のようにしてマウスに免疫した。

(2) 血中抗体価の測定

20 μ g/mlのFKBP-12のPBS溶液50 μ lをELISA用96ウェ
ルプレートの各ウェルに分注し、4℃で一晩放置した。ウェルのFKBP-12
溶液を吸引除去し、0.05% Tween 20/PBS溶液で3回洗浄した。プ
レートの各ウェルに0.2%ミルク/PBS溶液250 μ lを加え、室温で30
分間放置した。ウェルの0.2%ミルク/PBS溶液を吸引除去し、0.2%ミ
ルク/0.05% Tween 20/PBS溶液で希釈した各抗血清を100 μ l、
ウェルに加え、室温で2時間放置した。次いで、ウェルの抗血清希釈液を吸引除

去し、0.05% Tween 20/PBS溶液で3回洗浄した。0.2%ミルク/0.05% Tween 20/PBS溶液で1000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (H+L) 溶液を各ウェルに100 μ l加え、室温で2時間放置した。ウェルのアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (H+L) 溶液を吸引除去し、0.05% Tween 20/PBS溶液で5回洗浄した。その後、0.1mM 4-methylumbelliferyl phosphate (4MU-P; シグマ社) の緩衝液(10mM ジエタノールアミン/0.5% MgCl₂/H₂O)溶液を各ウェルに100 μ l加え、室温で15分間放置した。各ウェルの蛍光強度 (Excitation : 360nm, Emission : 460nm)を蛍光プレート・リーダーで測定した。

(3) 抗体価の一番強いマウスを選択し、4回目注射の10日後に最終免疫として、1.5mg/mlのFKBP-12のPBS溶液0.2mlをマウスの尾静脈から注射した。

(4) 細胞融合

実施例1-(4)と同じ方法で細胞融合を行い、ハイブリドーマ(3-3-D4-C6, 2C1-87及び3F4-70)を得た。

(5) 抗体の産生と精製

スクリーニング及びクローニングで得られたハイブリドーマ2C1-87、あるいはハイブリドーマ3F4-70を、それぞれF75フラスコに5 \times 10⁴ 個/ml (50ml/F75)になるように播種し、4日間培養後、培養液を遠心し、血清無添加培地で2回洗浄後、それぞれ0.5mlに浮遊させた。2週間前に、プリスタン0.5mlを腹腔内に注射したBALB/Cマウス(BALB/C, ♀, 6週令)の腹腔内へハイブリドーマ浮遊液0.5mlを移植した。10日後、マウスを開腹し、それぞれのマウスから腹水を5ml得た。それぞれの腹水をアフィゲルプロテインA MAPS-II キット(バイオラド)にて精製を行い、抗FKBP-12モノクローナル抗体2C1-87(サブタイプ: IgG, λ)及び3F4-70(サブタイプ: IgG, κ)精製抗体を得た。また、ハイブリドーマ3-3-D4-C6を同様に培養後、抗FKBP-12モノクローナル抗体3-3-D4-C6(サブタイプ: IgM)を得た。

実施例 3 FKBP-12濃度の測定（2ステップ法）

イムノプレートに抗マウスIgG（H+L）10 μ g/mlの溶液をウェル当たり50 μ l加え、4℃で一晩放置した後、0.05%Tween 20-PBSで3回洗浄する。0.2%ミルクブロッカー-PBS（200 μ l/ウェル）を室温下1時間作用させ、結合部分をブロックした後、更に0.2%ミルクブロッカー-0.05%Tween 20-PBS（50 μ l/ウェル）及び実施例1で得られた抗FKBP-12抗体（5-2-D1）培養液（50 μ l/ウェル）を加え4℃で1晩放置する。これを0.05%Tween 20-PBSで3回洗浄した後、0.05%Tween 20-PBSで段階希釈したFKBP-12（50 μ l/ウェル）を室温下、2.5時間反応させる。0.05%Tween 20-PBSで3回洗浄した後、500倍PBSで希釈したFK506-C32（LA）-POD溶液（50 μ l/ウェル）を添加し、室温で2時間放置する。0.05%Tween 20-PBSで5回洗浄した後、常法により、o-ジフェニルアミン/過酸化水素水で発色させ、FKBP-12の量に応じて、変化する発色の度合いを測定する。

上記方法を利用し、段階希釈したFKBP-12の代わりに正常ヒト血漿を測定したところ、FKBP-12濃度は約100 ng/mlであった。

これは、正常ヒト血漿1 mlにFKBP-12を1 μ g添加し、その回収率を測定する試薬からも、正確であることが確認された。

実施例 4 FKBPの濃度の測定（1ステップ法）

イムノプレートにFKBP-12 20 μ g/mlの溶液をウェル当たり50 μ l加え、4℃で1晩放置した後、0.05%Tween 20-PBSで3回洗浄する。1%ゼラチン-PBS 200 μ lを加え、室温1時間放置した後、0.05%Tween 20-PBSで、1回洗浄する。その後、0.05%Tween 20-PBSで段階希釈したFKBP-12 50 μ lと、1000倍PBSで希釈したFK506-C32（LA）-POD溶液50 μ lを添加し、室温で4時間反応させる。0.05%Tween 20-PBSで5回洗浄した後、通常のELISAと同様、o-フェニレンジアミンと過酸化水素水で発色する。

請求の範囲

1. FK506結合蛋白質中の抗原決定基を認識し、FK506結合蛋白質とFK506との結合を阻害することのないモノクローナル抗体。
2. FK506結合蛋白質がヒトFKBP-12である請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。
3. 固定化された請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体に、酵素により標識されたFK506及び被験試料中のFK506結合蛋白質を反応させることから成るFK506結合蛋白質濃度測定法。
4. 固定化されたFK506結合蛋白質に、酵素により標識されたFK506及び被験試料中のFK506結合蛋白質を反応させることから成るFK506結合蛋白質濃度測定法。
5. 請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体、FK506結合蛋白質及び酵素により標識されたFK506からなるFK506結合蛋白質の濃度を測定するためのキット。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12P21/08, G01N33/577, 33/68//C12N15/06
(C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12P21/08, C12N15/06-15/08,
G01N33/577, 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Journal of Biological Chemistry, Vol. 267, No. 14, (1992), T. Jayaraman et al., "FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor)" p. 9474-9477	4 1-3, 5
X A	Transplantation Proceedings, Vol. 23, No. 6, (1991), S.L. Rosborough et al., "Identification of FKBP-related protein with antibodies of predetermined specificity and isolation by FK506 affinity chromatography" p. 2890-2893	4 1-3, 5
X A	Nature, Vol. 346, (1990), R. F. Standaert et al., "Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein, FKBP" p. 671-674	4 1-3, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 29, 1993 (29. 11. 93)

Date of mailing of the international search report

December 21, 1993 (21. 12. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P21/08, G01N33/577, 33/68//
C12N15/06 (C12P21/08, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P21/08, C12N15/06-15/08,
G01N33/577, 33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Journal of Biological Chemistry, 第267巻, 第14号, (1992), T.Jayaraman et al. "FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor)" p.9474-9477	4 1-3, 5
X A	Transplantation Proceedings, 第23巻, 第6号, (1991), S.L.Rosborough et al. "Identification of FKBP-related	4 1-3, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.11.93

国際調査報告の発送日

21.12.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内 田 俊 生

電話番号 03-3581-1101 内線

4 B 8 2 1 4

3 4 4 9

C (続き), 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	<p>proteins with antibodies of predetermined specificity and isolation by FK506 affinity chromatography" p.2890-2893</p> <p>Nature. 第346巻, (1990), R. F. Standaert et al. "Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein, FKBP" p.671-674</p>	<p>4 1-3, 5</p>